

PATENT ABSTRACTS OF JAPAN

AJ

(11)Publication number : 2000-351799

(43)Date of publication of application : 19.12.2000

(51)Int.Cl.

C07K 1/34

C07K 14/78

(21)Application number : 11-160312

(71)Applicant : JCR PHARMACEUTICALS CO LTD

(22)Date of filing : 08.06.1999

(72)Inventor : SHIMIZU MITSUO
MIZUGUCHI KAZUNOBU
TSUDA AYAKO

(54) PRODUCTION OF FIBRONECTIN SOLUTION

(57)Abstract:

PROBLEM TO BE SOLVED: To obtain a fibronectin solution where both enveloped viruses and non-enveloped viruses have been removed through a sufficiently practical method for removing viruses by dissolving fibronectin in a specific medium and then making the solution pass through a specific filter.

SOLUTION: This method is to dissolve fibronectin in a medium which is an aqueous solution (pH 6-8.0) comprising (A) a pharmaceutically permissible chelating agent and (B) 1-30 mM pharmaceutically permissible buffer agent, and then to make the solution pass through a filter having a pore size of <18 nm. It is preferable that the ingredient A is ethylenediaminetetraacetic acid, its concentration is 0.1-2.0 mM, the ingredient B is selected from the group consisting of a phosphate buffer, a maleate buffer and a citrate buffer and the concentration of fibronectin is 0.1-3.0 mg/mL.

LEGAL STATUS

[Date of request for examination]

[Date of sending the examiner's decision of rejection]

[Kind of final disposal of application other than the examiner's decision of rejection or application converted registration]

[Date of final disposal for application]

[Patent number]

[Date of registration]

[Number of appeal against examiner's decision of rejection]

[Date of requesting appeal against examiner's decision of rejection]

[Date of extinction of right]

(19) 日本国特許庁 (J P)

(12) 公開特許公報 (A)

(11) 特許出願公開番号

特開2000-351799

(P2000-351799A)

(43) 公開日 平成12年12月19日 (2000. 12. 19)

(51) Int.Cl. ⁷	識別記号	F I	データベース* (参考)
C 0 7 K 1/34		C 0 7 K 1/34	4 H 0 4 J
14/78		14/78	

審査請求 未請求 請求項の数 6 O L (全 18 頁)

(21) 出願番号	特願平11-160312	(71) 出願人	000228545 日本ケミカルリサーチ株式会社 兵庫県芦屋市春日町3番19号
(22) 出願日	平成11年6月8日 (1999. 6. 8)	(72) 発明者	清水 光男 兵庫県神戸市垂水区小束山2丁目5-16
		(72) 発明者	水口 和信 兵庫県神戸市灘区城内通2丁目1番6-511号
		(72) 発明者	津田 綾子 兵庫県神戸市垂水区桃山台1-16 J C R COUR T317号室
		(74) 代理人	100104639 弁理士 早坂 巧 Fターム (参考) 4H045 AA20 CA42 GA10

(54) 【発明の名称】 フィブロネクチン溶液の製造方法

(57) 【要約】

【課題】 フィブロネクチン製剤の製造のための、エンベロープウイルス及び非エンベロープウイルス共に除去可能な、且つ十分な実用性のあるウイルス除去の方法を提供すること。

【解決手段】 フィブロネクチン溶液の製造方法であって、薬剤学的に許容し得るキレート剤及び1~30 mMの濃度の薬剤学的に許容し得る緩衝剤を含有するpH6~7.5の水溶液である媒質にフィブロネクチンを溶解させ、ポアサイズ18 nm未満のフィルターに通すことを特徴とする製造方法。

【特許請求の範囲】

【請求項1】フィブロネクチン溶液の製造方法であつて、薬剤学的に許容し得るキレート剤及び1～30 mMの濃度の薬剤学的に許容し得る緩衝剤を含有するpH 6～8.0の水溶液である媒質にフィブロネクチンを溶解させ、ポアサイズ18 nm未満のフィルターに通すことを特徴とする製造方法。

【請求項2】該緩衝剤がリン酸塩緩衝剤、マレイン酸塩緩衝剤及びクエン酸塩緩衝剤よりなる群より選ばれることを特徴とする、請求項1の製造方法。

【請求項3】キレート剤がエチレンジアミンテトラ酢酸であることを特徴とする、請求項1又は2の製造方法。

【請求項4】キレート剤濃度が0.1～2.0 mMであることを特徴とする、請求項1ないし3の何れかの製造方法。

【請求項5】フィブロネクチン濃度が0.1～3.0 mg/mlである、請求項1ないし4の何れかの製造方法。

【請求項6】該媒質に溶解させたフィブロネクチン溶液を該フィルターに通した後、該フィルターに、キレート剤及び1～30 mMの濃度の緩衝剤を含有するpH 6～8.0の水溶液を通すステップを含むことを特徴とする、請求項1ないし5の何れかの製造方法。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】本発明は、血漿由来タンパク質であるフィブロネクチンの濾液の製造方法に関し、より詳しくは、ウイルス等の病原性因子の除去のためにフィブロネクチン水溶液を濾過して濾液を得るための方法に関する。

【0002】

【従来の技術】血漿由来タンパク質の製剤には、感染性の病原性ウイルスの混入の危険がつきまといっている。ヒトに感染するウイルスは、エンベロープウイルスと非エンベロープウイルスとに大別される。エンベロープウイルスのうち重得な疾病を引き起こすものとしてはHIV（AIDSウイルス）、HTLV-1等のヒト白血病ウイルス、HBV、HCV等の肝炎ウイルス、EBウイルス、ヘルペスウイルス等が存在し、非エンベロープウイルスのうちではポリオウイルスやバクテリオファージが知られている。

【0003】血液製剤の投与には、供血者の血漿に存在している可能性のある上記感染性因子による患者の感染の危険が伴う。このため、血漿由来タンパク質の製剤化に際しては、これら感染性因子の混入を防ぐ目的でPCR法等の高感度なウイルス検出法を用いて原材料たる血漿を試験し、ウイルスに汚染された血漿を排除することが、第一に行われている。しかしながら、ウイルスの混入を調べるための如何なる試験法も、その検出感度には限界がある。血液製剤を製造する場合、製剤中に混入し

ているかも知れないそれらの感染性因子の不活性化及び除去の工程を設けることは、従って、必須項目である。そのため、血漿由来のタンパク質製剤中のウイルスを不活性化して製剤の安全性を確保するための種々の方法が考案されてきた。

【0004】それらのうち主として用いられている方法は、血液由来タンパク質製剤を、タンパク質安定化剤の共存下に加熱することによるものである。一般には液状熱処理法がおこなわれ、それによればタンパク質安定化剤としてアルブミン、糖類又はアミノ酸が用いられ、60℃、10時間の加熱処理が行われる〔特開平5-186358号〕。EP0052827-A2には、第VIII因子、フィブロネクチン、グロブリン等のタンパク質の熱処理法が開示されている。

【0005】しかし、液状熱処理法は、熱に不安定なタンパク質に適用すると熱変性を引き起こしやすく、特に、血漿タンパク質であるフィブロネクチンは熱変性しやすい。そのため、液状熱処理法の利用は、熱安定性のタンパク質に限定されている。

【0006】他方、有機溶媒及び界面活性剤を用いる、いわゆるソルベント・デタージェント法（SD法）によるウイルス不活性化法が確立されている〔Solvent/Detergent Technology Handbook, Version 2.0 (1996), New York Blood Center (USA)〕。この方法は、肝炎ウイルスやHIVウイルス等のエンベロープウイルスの不活性化に著しく効果がある。このため、ソルベント・デタージェント法は、血液製剤のウイルス処理法として日・米・欧の血液製剤メーカーによって広く利用されており、取り分け、熱に不安定なタンパク質での殺菌及びウイルス不活性化処理に繁用されている。

【0007】しかしながら、ソルベント・デタージェント法は、非エンベロープウイルスの不活性化に対しては、殆ど効果がないことが知られている。

【0008】血漿タンパク質であるフィブロネクチンは、熱処理に不安定なタンパク質である。このためウイルスの液状熱処理法は適用できない。また、タンパク質によっては利用可能な方法として、フィルター濾過によるウイルス除去方法があるが、フィブロネクチンは長鎖の高分子であるためフィルター濾過では回収率が極めて低くなり、実際には利用できない。

【0009】そのためフィブロネクチン製剤のウイルス不活性化法としては、これまでソルベント・デタージェント法のみが利用可能であり、混入のおそれのある非エンベロープウイルスの効果的な除去法は確立されないままとなっている。

【0010】

【発明が解決しようとする課題】本発明は、この問題を解決して、フィブロネクチン製剤の製造のための、エンベロープウイルス及び非エンベロープウイルス共に除去可能な、且つ十分な実用性のあるウイルス除去の方法を

提供することを目的とする。

【0011】本発明者は、濾過法によるフィブロネクチン製剤中のウイルス除去の潜在的可能性に着目し、ウイルスの通過を阻止する小さなポアサイズのフィルターを用いながらしかもフィブロネクチンを高い回収率で効率的に濾過する方法を見出すために研究を行った。その結果、種々のウイルスを除去できる十分小さいポアサイズのフィルターを用いても、フィブロネクチンを含有する媒質をある特定の条件に適合するものとしておくことにより、濾液中のフィブロネクチンの回収率を飛躍的に高めることができることを見出した。

【0012】

【課題を解決するための手段】すなわち本発明は、フィブロネクチン溶液の製造方法であって、薬剤学的に許容し得るキレート剤及び1～30mMの濃度の薬剤学的に許容し得る緩衝剤を含有するpH6～8.0の水溶液である媒質にフィブロネクチンを溶解させ、ポアサイズ18nm未満のフィルターに通すことを特徴とする製造方法を提供する。

【0013】本発明で用いるフィルターにおける18nm未満というポアサイズは、最小サイズの新エンベロープウイルスであるパルボウイルスの直径18～24nmより小さい。このため、他のウイルスは勿論のこと、パルボウイルスをも有効に除去できる。従って、本発明は、エンベロープウイルス及び非エンベロープウイルスの両方について優れた除去方法を提供する。またフィブロネクチンは溶液状態では凝集や析出をする傾向があり、特に、小さいポアサイズフィルターを用いる濾過はフィブロネクチンの回収率が低過ぎて従来実用化できなかったが、本発明に従ってフィブロネクチンを含有する媒質を調製することにより、フィブロネクチンの凝集・析出を抑え非常に効率よく回収することができる。このため、本発明は、血漿からのフィブロネクチン製剤の製造工程に有利に適用することができる。本発明の方法は、知られている最小サイズのウイルスでも効果的に除去できるため、安全なフィブロネクチン製剤の提供における有用性が大きい。

【0014】

【発明の実施の形態】本発明で用いるフィルターとしては、メンブランフィルターを用いることができるが、18nm未満のポアサイズのもので入手できるのであれば他のフィルターを用いることも可能である。現在商業的に入手できるフィルターの例としては、ポアサイズ15nmの限外濾過フィルター「PLANOVA 15」（登録商標）（セルロースによる中空糸膜：旭化成工業（株））が挙げられる。

【0015】本発明で用いられるフィルターのポアサイズには特に明確な下限はなく、入手可能なフィルターから、フィブロネクチンが実用上通過できるサイズのものを選択すればよい。

【0016】本発明において用いる緩衝剤として特に好ましいのは、緩衝剤がリン酸塩緩衝剤、マレイン酸塩緩衝剤、及びクエン酸塩緩衝剤である。これらの緩衝液は、何れも注射剤として採用されているものであるため、使用において安全性が高い。

【0017】また本発明において用いるキレート剤として特に好ましい一例は、エチレンジアミンテトラ酢酸である。エチレンジアミンテトラ酢酸はやはり、注射剤への添加剤として実績があるため、安全性の保証が容易である。なお、本明細書において「エチレンジアミンテトラ酢酸」というときは、遊離酸のみならずその塩、例えばナトリウム塩等のアルカリ金属塩をも包含する。

【0018】本発明において、キレート剤濃度としては、0.1～2.0mMであることが好ましく、0.2～1.0mMであることが更に好ましい。

【0019】また本発明において、フィブロネクチン濃度としては、0.1～3.0mg/ml程度の範囲であることが好ましく、0.2～1.5mg/ml程度の範囲であることが更に好ましい。

【0020】本発明者等は、ポアサイズ15nmのフィルターを用いて、血漿タンパク質であるフィブロネクチン分画に、ウイルス（ウシ口内炎ウイルス、ヒト単純ヘルペスウイルス、ポリオウイルス、パルボウイルス）を添加して、それらをそれぞれフィルター濾過して、濾過効率を調べた。その結果、フィルター濾過のステップで、ウシ口内炎ウイルスの場合 4.2×10^6 以上、ヒト単純ヘルペスウイルスの場合 1.0×10^5 以上、ポリオウイルスの場合 2.3×10^6 以上、更に、最小のウイルスであるパルボウイルスに関して 1.0×10^3 以上の除去効率が見出された（表2～5）。

【0021】ヒトパルボウイルスのモデルとしてブタパルボウイルスを用い、これに対しポアサイズ15nm及び35nmの2種類のフィルターを通した濾過による除去率を比較した。除去効率の評価には、ウイルスの生物学的性質である感染性について、細胞変性効果（CPE）（図1）及び赤血球凝集反応（HA）（図2及び3）を用いた。また、ウイルス核酸のPCR法を用いた検出試験によっても比較検討した。パルボウイルスの直径は18～24nmであり〔The Lancet, 343: p.798 (1994)〕、ポアサイズ35nmのフィルターは通過すると予測されていたが〔国立予防衛生研究所学友編：ウイルス実験学 総論、丸善（1973）〕、ブタパルボウイルスの場合、ポアサイズ35nmのフィルターによる濾過では、 1×10^3 倍希釈まで感染が確認された。このことはブタパルボウイルスがポアサイズ35nmのフィルターを予測通り容易に通過することを示しており、やはり35nmのポアサイズのフィルターがウイルス除去目的には不適当であることを確認するものである。

【0022】これに対してポアサイズ15nmのフィルターを用いた場合は、パルボウイルス原液を濾過して

も、通過した汚液中についての細胞変性効果及び赤血球凝集反応による試験でウイルスは検出されず、ポアサイズ15 nmのフィルターによる著しく優れた除去効果が確認された。一方、PCR法によるウイルスDNAの検出試験では、ポアサイズ15 nmのフィルターによっても、 1×10^3 倍希釈までウイルスDNAが検出されたが、これはウイルス粒子自体の通過でなく、ウイルスDNAの断片が通過したことによると考えられる。

【0023】ポアサイズ15 nmのフィルターを通過したフィブロネクチンは、SDS-PAGE上やBHK細胞接着能試験、及び抗体との反応性において汚過の前後で変化が見られず、フィブロネクチンの基本的な構造及び機能に差違は認められなかった。

【0024】

【実施例】以下、典型的な実施例を挙げて本発明を更に詳細に説明するが、本発明がこれらの実施例に限定されることは意図しない。

【0025】(1) 材料

(a) 試薬類としては下記のものを用いた。イーグルMEM培地「ニッスイ」(1) (日水製薬)、ダルベッコPBS (-) 粉末「ニッスイ」(日水製薬)、トリプシン(DIFCO)、EDTA・2Na (DOJINDO) ウシ胎児血清(JRH Bioscience)、L-グルタミン(和光純薬工業)、7%炭酸水素ナトリウム注射液(扶桑薬品)、 $10 \times$ 反応緩衝液(Promega)、塩化マグネシウム溶液(Promega; 25 mM)、taq DNAポリメラーゼ(Promega; $5U/\mu l$)、dATP (宝酒造; $100\mu M$)、dGTP (宝酒造; $100\mu M$)、dCTP (宝酒造; $100\mu M$)、dUTP (Sigma; $100\mu M$)、ウラシルDNAグルコシラーゼ(GIBCO BRL; $1U/\mu l$)、 $\phi x174/HincII$ (東洋紡績)、プロテイナーゼK (宝酒造; $20mg/ml$)、STE緩衝液(10M Tris-HCl, 10mM NaCl, 1mM EDTA, pH 7.6)、0.5% SDS-STE緩衝液、グリコーゲン(Boehringer Mannheim; $20mg/ml$)、3M酢酸ナトリウム(ニッポンジーン)、クロロホルム(和光純薬工業)、イソアミルアルコール(和光純薬工業)、TE飽和フェノール(ニッポンジーン)、TE緩衝液(10M Tris-HCl, 1mM EDTA, pH 7.6)、グリシン(和光純薬工業)、Tween 80 (和光純薬工業; 化学用Polyoxyethylene(20)Sorbitan Monooleate)、並びに、抗ヒトフィブロネクチンモノクローナル抗体として抗コラーゲン結合部位(FN4-4)、抗細胞接着部位(FN12-8)、抗N末フィブリンヘパリン結合部位(FN9-1)及び抗C末ヘパリン結合部位(FN3-8) (いずれも宝酒造)。

【0026】(b) 機材及びフィブロネクチンとしては次のものを用いた。加圧ポンプ(Linicon LC-910: NITTO KOKI,)、マイクロチューブポンプ(MP-3: 東京理科機械)、限外濾過システム(ProFlax M12: アミコン)、フィブロネクチン(ヒト血漿由来: 日本ケミカル

リサーチ製)、ブタバルボウイルス原液(CPE法、 $10^{5.5}TICD_{50}$)、限外濾過フィルター(PLANOVA 15nm, PLANOVA 35nm: 旭化成)。

【0027】(c) ウイルス及び培養細胞

ウシ水疱性口内炎ウイルス(VSV)は、ニュージャージー株(家畜衛生試験所)を用いた。ヒト羊膜由来FL細胞(国立衛生研究所)にVSVを感染増殖させ、ペトリ皿に播種してウイルスをブランク法により定量した。ヒト単純ヘルペスウイルスI型(HSV-1)はF株(アラバマ大学臨床ウイルス学教室)を用いた。サル腎由来のVero細胞(大日本製薬)にHSV-1を完成させた。24ウェルマルチディッシュプレートに播種して、ウイルスをブランク法により定量した。ポリオウイルス(Sabin 1)は、国立衛研研究所から入手して、このウイルスをVero細胞に感染させ3cmのペトリ皿に播種し、ウイルスをブランク法により定量した。ブタバルボウイルスとしては90HS株(京都微生物化学研究所)を用いた。ブタ腎由来のESK細胞(京都微生物化学研究所)にブタバルボウイルスを感染増殖させ、48ウェルマイクロプレートに播種したESK細胞を用いて、ウイルスをTCID₅₀法/HA法により定量した。

【0028】(d) ウイルス液の調製: ブタバルボウイルス原液につき、5%ウシ胎児血清/イーグルMEM培地・3%炭酸ナトリウムにて、 1×10^{10} 倍希釈までの10倍段階希釈を行った。

【0029】(2) フィブロネクチン汚液の調製: 5mMリン酸ナトリウム、1mM EDTA・2Na (pH 7.4)の希釈用緩衝液で濃度調製したフィブロネクチン($1.0mg/ml$)の溶液18mlに、上記(d)で調製したウイルス液(原液 $\sim 1 \times 10^{10}$ 倍希釈ウイルス液)2mlを添加して、ポアサイズ0.22 μm のメンブランフィルターで汚し、更に、希釈液で平衡化したPLANOVA膜(0.001m²又は0.01m²、ポアサイズ15nm又は35nm)を通過させることにより、フィブロネクチン汚液とした。

【0030】(3) 細胞変性効果(CPE)の観察

(a) ESK細胞懸濁液の調製: ESK細胞を常法によりトリプシンで消化して、細胞懸濁液を作成し、細胞数が $2.0 \sim 2.3 \times 10^4$ 個/mlとなるように調製した。

【0031】(b) サンプル液の調製: ブタバルボウイルス原液につき、5%ウシ胎児血清/イーグルMEM培地・3%炭酸ナトリウムにて、 1×10^{10} 倍希釈までの10倍段階希釈を行うことによりウイルス標準液を調製した。また、5mMリン酸ナトリウム、1mM EDTA・2Na (pH 7.4)の希釈用緩衝液で濃度調製したフィブロネクチン($1.0mg/ml$)の溶液18mlに、ブタバルボウイルス原液2mlを添加することにより調製したウイルス・フィブロネクチン液(「チャージ液」という。)につき、同様に5%ウシ胎児血清/イーグルMEM培地・3%炭酸ナトリウムにて、 1×10^{10} 倍希釈まで

の10倍段階希釈を行うことにより希釈チャージ液を調製した。また、これらの溶液の各一部分を、ポアサイズ35 nm又は15 nmのフィルター (PLANOVA: 旭化成) で濾過することにより、フィルター滲液を得た。

【0032】(c) ESK細胞の培養: 上記(a)にて調製したESK細胞を、48ウェルプレートの各ウェルに0.5 mlずつ分注し、更に、上記(b)に記載のウイルス標準液、チャージ液又はフィルター滲液を0.1 ml添加し、37℃、5% CO₂にて7~10日間静置培養した。

【0033】(d) CPEの観察と結果
培養7日目から、感染価の高いブタパルボウイルスを添加したESK細胞にCPEが現れた(図1(b))。これらの細胞の形態変化を顕微鏡により観察した。ポアサイズ35 nmのフィルターによる滲液では、ウイルス原液~1×10³倍希釈液まで、培養細胞に図1(b)で例示したようなCPEが観察された。これに対し、ポアサイズ15 nmのフィルターによる滲液では、ウイルス原液を添加した細胞でCPEを指標とした感染が観察されたのみであり、他のフィルター滲液では何れもCPEは観察されず図1(a)で例示したような正常な細胞形態が見られた。このように、ポアサイズ15 nmのフィルターは、知られている最小サイズのウイルスに対して、著しい除去効果を示した。

【0034】(4) HA値の測定

(a) モルモット赤血球 (0.5%赤血球) 浮遊液の調製: シリンジにヘパリンをコートしてモルモットの心臓から血液1 mlを採取した。採血後にPBS (-) 溶液を用いて2000 rpm、5分間の遠心を2回行った後、2500 rpm、10分の遠心を行うことにより洗浄した。洗浄後に、赤血球0.5 mlをPBS (-) 溶液100 mlに懸濁させ、0.5%赤血球浮遊液とした。

【0035】(b) サンプル液の調製: ブタパルボウイルス原液につき、5%ウシ胎児血清/イーグルMEM培地・3%炭酸ナトリウムにて、1×10¹⁰倍希釈までの10倍段階希釈を行うことにより希釈ウイルス液を調製した。また、5 mMリン酸ナトリウム、1 mM EDTA・2 Na (pH7.4) の希釈用緩衝液で濃度調製したフィブロネクチン (1.0 mg/ml) の溶液18 mlに、ブタパルボウイルス原液2 mlを添加することにより調製したウイルス・フィブロネクチン液 (「チャージ液」という。) につき、同様に5%ウシ胎児血清/イーグルMEM培地・3%炭酸ナトリウムにて、1×10¹⁰倍希釈までの10倍段階希釈を行うことにより希釈チャージ液を調製した。また、チャージ液及び希釈チャージ液の一部を、ポアサイズ35 nm及び15 nmのフィルター (PLANOVA: 旭化成) で濾過することにより、滲液を得た。

【0036】(c) サンプルの添加及び評価方法: V底の96ウェルプレートに上記の無希釈~1×10¹⁰倍希釈のウイルス標準液、チャージ液又はフィルター滲液を50 µl、PBS (-) 溶液50 µl、及び0.5%モルモット赤

血球浮遊液100 µlを添加して密封した。プレートミキサーを用いて攪拌した後、1~2時間室温で静置した。ブランクとして、ウイルス無添加のESK細胞培養上清液を使用した(図2及び3における「C」)。赤血球が凝集すれば陽性、凝集しなければ陰性と判定した。

【0037】(d) 結果: ウイルス標準液では、原液から1×10⁴倍希釈まで、またチャージ液では無希釈~1×10³倍希釈まで、赤血球の凝集が認められた(図2を参照: 図2以降において希釈倍率1×10ⁿ倍は単に10ⁿと略記)。またポアサイズ35 nmフィルターを通した無希釈~希釈チャージ液でも1×10⁴倍希釈まで赤血球の凝集が確認された(図3のプレートの右半分)。これに対して、ポアサイズ15 nmのフィルターによる滲液では、いずれも赤血球凝集は認められず、ウイルスが効果的に除去されていることが確認された(図3のプレートの左半分)。

【0038】(5) PCRによるウイルスDNAの検出
(a) ブタパルボウイルスDNAの抽出方法: ウイルス標準液、チャージ液及びフィルター滲液 (100 µl) にSTE緩衝液 (900 µl) を加え、混合後4℃にて15000 rpm、90分間の遠心分離処理を行った。遠心分離後、沈殿に0.5% SDS-STE緩衝液 (100 µl)、10 mg/mlのプロテイナーゼK 2.5 µlを加えて混合した。55℃にて5分間加熱した後、室温にて25分間清置した。

【0039】フェノール: クロロホルム: イソアミルアルコール (25:24:1) 100 µlを加え、4℃にて15000 rpm、10分間遠心分離を行った後、水層に20 mg/mlのグリコゲン1 µl、3 M酢酸ナトリウム100 µl、エチルアルコール200 µlを添加した。-80℃にて30分間静置した後、4℃にて15000 rpm、5分間遠心分離を行った。沈殿物に80%にエチルアルコール1000 µlを添加して、更に4℃にて15000 rpm、10分間の遠心分離操作を行った。沈殿物を吸引乾燥処理し、得られた沈殿乾燥物をTE緩衝液20 µlに溶解させてブタパルボウイルスDNA抽出液とした。

【0040】(b) ブタパルボウイルスDNAの検出方法: ウイルスDNAの検出は、Nested-PCRにて行った。第1次PCR反応溶液 (20 µl) [10×反応緩衝液 (2.0 µl)、25 mM塩化マグネシウム溶液 (1.2 µl)、1.0 mM dNTPs混合物 (2.0 µl)、ウラシルDNAグルコシラーゼ (1 U/µl) (0.5 µl)、0.2 M PB-1 (1.0 µl)、0.2 M PB-2 (1.0 µl)、Taq DNAポリメラーゼ (0.5 U/µl) (1.0 µl)、ブタパルボウイルスDNA抽出液 (2.0 µl)、SDDW (9.3 µl)] を調製し、第1次PCRを行った。最初に、37℃、15分間のウラシルDNAグルコシラーゼ (UDG) 処理を行い、94℃にて4分間の処理によりUDGを失活させた。その後、増幅反応として94℃1分間、55℃2分間のサイクルを35回繰り返した。次に第1次PCR産物を鋳型DNAとして、第2次PCR反応液 (20 µl

1) [10×反応緩衝液 (2.0μl)、25mM塩化マグネシウム溶液 (1.2μl)、1.0mM dNTPs 混合物 (2.0μl)、20μM PB-3 (1.0μl)、20μM PB-4 (1.0μl)、Taq DNAポリメラーゼ (0.5U/μl) (1.0μl)、第1次PCR産物 (2.0μl)、SDDW (9.8μl)] を調製し、第2次PCRを行った。増幅反応は第1次PCRと同様に行った。プライマーは第1次PCR用のプライマーとしてPB-1 (配列表の配列番号1)、PB-2 (配列表の配列番号2) を、第2次PCR用のプライマーとしてPB-3 (配列表の配列番号3)、PB-4 (配列表の配列番号4) を使用した。PCR産物は、3.0%アガロース電気泳動で確認した。

【0041】(c) 結果: PCRによる検出の結果、ウ

	HA	CPE	PCR
ウイルス標準液	1×10^4	1×10^3	1×10^7
チャージ液	1×10^3	1×10^3	1×10^6
35nmフィルター濾液	1×10^3	1×10^3	1×10^5
15nmフィルター濾液	—	—	1×10^3

【0044】(6) 各精製工程のフィブロネクチン分画及びウイルスの除去効率の評価

(a) 行程 (1)

血漿のクリオ沈殿物約10gを、5倍量 (V/W) のヘパリンナトリウム液 (1%エタノール、3単位/mlヘパリンナトリウム) で溶解し、工程前試料液とした。この溶液にウイルス液を1/10 (V/W) 量添加した。次に、3%の水酸化アルミニウム懸濁液を調製して、溶解液に1/10 (V/V) 量を添加して、pH6.0~6.2に攪拌調整した。約5℃の低室温にて30分間程消置し、遠心分離により水酸化アルミニウム含有の沈殿を回収した。回収した沈殿に5倍量 (V/W) の10mMリン酸塩-0.12M NaCl緩衝液 (pH7.4) を加えて溶解した。更に、グリシンを最終濃度が2Mとなるように添加してpH7.0~7.4に調整した。30分間室温にて静置後、遠心分離操作により上清を回収し、この上清を工程後試料液とした。

【0045】(b) 工程 (2)

ウイルス無添加の工程 (1) の条件で得られた上清に、ウイルス液を1/10 (V/V) 量添加混合し、工程前試料液とした。この前試料液に、TNBP、Tween80をそれぞれ最終濃度が0.3% (V/V)、1.0% (V/V) となるように添加し、25℃にて6時間以上攪拌保持し、これを工程後の試料液とした。

【0046】(c) 工程 (3)

ウイルス標準液では 1×10^7 倍希釈まで (図4)、チャージ液では 1×10^6 倍希釈まで (図5)、ポアサイズ35nmのフィルターの濾液では 1×10^5 倍希釈まで (図6)、それぞれウイルスDNAが検出されたが、これに対し、ポアサイズ15nmのフィルターの濾液では 1×10^3 倍希釈を超えるとウイルスDNAは検出されなかった (図7)。

【0042】HA、CPE及びPCRの結果につき、ウイルス検出限度以下となる希釈倍率を次の表1にまとめる。

【0043】

【表1】

ウイルス無添加の工程 (1) の条件で得られた上清に、ウイルス液を1/10 (V/V) 量添加混合して工程前試料液とした。前試料液を、10mMリン酸塩-0.12M NaCl緩衝液 (pH7.4) で十分に平衡化させたゼラチンセファロースカラムに負荷させた後に、緩衝液で非吸着物を十分に洗い流した。次いで溶出緩衝液 (0.1M酢酸ナトリウム-1M臭化ナトリウム (pH5.0)) により、吸着しているフィブロネクチンを溶出させて工程後の試料とした。

【0047】(d) 工程 (4)

ウイルス無添加の工程 (1) ~ (3) で精製されたフィブロネクチン溶液を、5mMリン酸塩緩衝液-1mMEDTA・2Na (pH7.4) で十分透析して緩衝液交換し、同緩衝液でフィブロネクチン溶液 (1mg/ml) を調製した。この溶液にウイルス液を1/10 (V/V) 量添加して工程前試料液とした。工程前試料液 (20ml) をウイルス除去フィルター (15nm、0.001m²) に負荷して、工程後試料とした。

【0048】(e) 処理前試料並びに処理後試料液のウイルス定量結果 (n=3)

(i) 添加ウイルスがウシ口内炎ウイルス (VSV) の場合、次の表2に示すように、工程2, 3, 4の全体で $>1.1 \times 10^{15}$ の除去効率を示した。

【0049】

【表2】

		実験	除去効率 (処理前／処理後)
工程 1	処理前	1.0×10^6	1×10^1
	処理後	1.0×10^6	
工程 2	処理前	4.8×10^6	$> 1.5 \times 10^5$
	処理後	3.3×10	
工程 3	処理前	5.5×10^5	1.7×10^4
	処理後	3.0×10	
工程 4	処理前	4.2×10^6	$> 4.2 \times 10^6$
	処理後	< 1	

【0050】(ii) 添加ウイルスがヒト単純ヘルペスウイルス (HSV) の場合、次の表3に示すように、工程 2、3、4全体で $> 4.7 \times 10^{11}$ の除去効率を示した。

【0051】
【表3】

		実験	除去効率 (処理前／処理後)
工程 1	処理前		—
	処理後	2.5×10^4	
工程 2	処理前	2.4×10^4	$> 1.8 \times 10^3$
	処理後	$< 1.3 \times 10^4$	
工程 3	処理前	3.4×10^4	$> 2.6 \times 10^3$
	処理後	$< 1.3 \times 10^4$	
工程 4	処理前	1.3×10^6	$> 1.0 \times 10^5$
	処理後	$< 1.3 \times 10$	

【0052】(iii) 添加ウイルスがポリオウイルスの場合、表4に示すように、工程3、4の全体で $> 1.1 \times 10^9$ の除去効率を示した。

【0053】
【表4】

		実験	除去効率 (処理前／処理後)
工程 1	処理前	-	-
	処理後	6.0×10^3	
工程 2	処理前	1.0×10^5	1.6
	処理後	6.0×10^4	
工程 3	処理前	2.2×10^6	$> 5.0 \times 10^2$
	処理後	3.9×10^2	
工程 4	処理前	2.3×10^6	$> 2.3 \times 10^6$
	処理後	< 1	

【0054】(iv) 添加ウイルスがパルボウイルスの場合、表5に示すように、工程4のみで $>1.0 \times 10^3$ の除去効率を示した。

【0055】
【表5】

		実験	除去効率 (処理前／処理後)
工程 4	処理前	1.0×10^3	$> 1.0 \times 10^3$
	処理後	< 1	

【0056】(7) 濾過によるフィブロネクチン回収率の改善

フィブロネクチンの濾過のための適切な条件を検討するため、各種の媒質にフィブロネクチンを溶解し、フィルターで濾過して、濾液中などのフィブロネクチン濃度を測定してフィブロネクチン回収率を求めた。

【0057】フィブロネクチンを溶解させる媒質としては、次の3種類のリン酸塩緩衝液を用いた。

- ・ 5 mM リン酸塩緩衝液 (pH 7.4) (緩衝液 I)
- ・ 1 % Tween80 含有 5 mM リン酸塩緩衝液 (pH 7.4) (緩衝液 II)
- ・ 1 mM EDTA 含有 5 mM リン酸塩緩衝液 (pH 7.4) (緩衝液 III)

【0058】溶液中のフィブロネクチン濃度は、分子吸光係数 ($E_{1\%}$) 13.0 より求めた。

【0059】(a) フィブロネクチン濃度 1 mg/ml での検討

上記の各緩衝液 150 ml にフィブロネクチンを 150 mg を溶解させ、1 mg/ml のフィブロネクチン溶液各 150 ml を調製した。これらのフィブロネクチン溶液を、加圧ポンプを用いて圧力 0.5 kg/cm² 以下の圧力で、それぞれポアサイズ 15 nm のフィルター (0.01 m², PLANO VA: 旭化成) を通して濾過し、濾液中のフィブロネクチン濃度を測定してフィルター通過率を求めた。

ン濃度を測定してフィルター通過率を求めた。

【0060】結果を図8に示す。フィブロネクチン溶液 150 ml をフィルターに通過させて得られた濾液 (「初回通過液」: 緩衝液によるフィルター洗い出し工程を含まない濾液) 中へのフィブロネクチン回収率は、緩衝液 I を用いたフィブロネクチン溶液では約 50%、緩衝液 II を用いたフィブロネクチン溶液では約 60%、緩衝液 III を用いたフィブロネクチン溶液では約 50% であった (図8の左側の3本のヒストグラム参照)。

【0061】膜上に残留すると考えられたフィブロネクチン量を確認するため、フィルターに対し反対方向からそれぞれの緩衝液を通すことによりフィルターを逆方向洗浄し、逆方向洗浄液中のフィブロネクチン量を測定した。その結果各フィルターについて得られたフィブロネクチン量を比較すると、緩衝液 III によるものが顕著に高かった (図8の中央の3本のヒストグラム参照)。初回通過液中に回収されたフィブロネクチン量とフィルターの逆方向洗浄液より回収されたフィブロネクチン量とを合計すると、緩衝液 III (キレート剤である EDTA 含有の低塩濃度緩衝液) ではほぼ 100% のフィブロネクチンの回収を見たのに対し、緩衝液 I (キレート剤を含まない) では約 60%、緩衝液 II (非イオン界面活性剤である Tween80 を含有) でも約 80% のフィブロネクチンし

か回収できなかった(図8の右側の3本のヒストグラム参照)。このように、緩衝液IIIを用いたときは、フィブロネクチンが損失なくフィルターを通過又はフィルターから回収できたのに対し、緩衝液Iでは約40%のフィブロネクチンが失われ、緩衝液IIでも約20%のフィブロネクチンが失われた。この結果は、緩衝液Iでは、フィブロネクチンのフィルターへの吸着等のような何らかの実質的に非可逆的な相互作用が起こった可能性を示唆している。また、緩衝液IIIを用いた場合、フィルター等とのそのような非可逆的な相互作用が防止できることも示唆している。また、緩衝剤IIを用いたときは、フィブロネクチン溶液の濾過時のフィルター通過は優れていたが、フィルターの逆方向洗浄液中の回収率は低く、フィルター等との何らかの非可逆的な相互作用の存在が窺われる。

【0062】(b) フィブロネクチン濃度5mg/mlでの検討：上の結果を参考として、次に、より高濃度のフィブロネクチン溶液を用いてフィブロネクチンの濾過効率を検討した。試料として、上記緩衝液II及びIIIをそれぞれ30ml用いて各150mgのフィブロネクチンを溶解することにより、5mg/mlの濃度の3種類のフィブロネクチン溶液各30mlを調製した。これらのフィブロネクチン溶液について、上記と同様に、加圧ポンプを用いて圧力0.5kg/cm²以下の圧力で、それぞれポアサイズ15nmのフィルター(0.01m²、PLANOVA：旭化成)で濾過し濾液中のフィブロネクチン量を測定し、次いで、同じ緩衝液で各フィルターを逆方向洗浄して得た洗浄液中に回収されたフィブロネクチン量を測定し、相互に比較した。

【0063】その結果、フィブロネクチン溶液を単にフィルターで濾過するのみでフィルターの洗浄を行わない初回通過液中のフィブロネクチン量は、緩衝液II及び緩衝液IIIでそれぞれ約10%及び15%に止まった(図9の左側の2本のヒストグラムを参照)。しかしながら、フィルターの逆方向洗浄により多量のフィブロネクチンが回収され(図9の中央の2本のヒストグラムを参照)、初回通過液中のフィブロネクチン量とフィルターの逆方向洗浄液中に回収されたフィブロネクチン量とを合計すると、緩衝液II及びIIIで共に約95%の回収が得られた(図9の右側の2本のヒストグラムを参照)。この結果は、溶液中のフィブロネクチンの濃度が5mg/mlと高いと、溶液を単にフィルターを通過させただけではフィブロネクチンのフィルター通過が著しく低下することを示している。また、フィルターの逆方向洗浄によってかなりの効率でフィブロネクチンが回収されるものの、約5%の損失が生じたことは、フィブロネクチン濃度の上昇と共にフィルターへの吸着など何らかの非可逆的な相互作用の影響が増す可能性も示唆している。またこれに関し、緩衝液IIを用いたときのフィブロネクチンの回収率がフィブロネクチン濃度1mg/mlの場合と比較し

て高まったのは、高濃度のフィブロネクチンによってフィルターの吸着部位等がマスクされた可能性も考えられる。

【0064】(c) フィルター洗い出しを伴うフィブロネクチン濾過の検討

緩衝液II及び緩衝液IIIを用いて、1mg/mlの濃度のフィブロネクチン溶液を各150ml調製した。これらの溶液を、加圧ポンプを用いて0.5kg/cm²以下の以下でそれぞれポアサイズ15nmのフィルター(0.01m²、PLANOVA：旭化成)で濾過し、次いで各フィルターにそれぞれの緩衝液50mlを同じ方向に通過させることによりフィルターを洗い出して洗浄液を回収した。濾液及びフィルター洗浄液中のフィブロネクチン量をそれぞれ測定し、フィブロネクチンの回収率を算出した。

【0065】最初の濾液中のフィブロネクチンは、緩衝液IIを用いたものでは約60%、緩衝液IIIを用いたものでは約65%であった(図10の左側の2本のヒストグラムを参照)。少量の緩衝液によるフィルターの洗い出しにより、緩衝液と共にフィルターを通過して各洗浄液中にフィブロネクチンが回収された(図10の中央の2本のヒストグラムを参照)。フィルター洗浄中のフィブロネクチンの回収率は、キレート剤含有の緩衝液IIIを用いたもので高く、その結果、最初の濾液及び洗浄液を合わせたフィルターを通したフィブロネクチンの全体の回収率は、緩衝液IIIを用いたもので約90%に達したが、これに対し界面活性剤含有の緩衝液IIでは全体の回収率は約75%に止まった(図10の右側の2本のヒストグラムを参照)。この結果は、キレート剤を含有する緩衝液をフィブロネクチンの媒質とし、比較的少量の緩衝液によるフィルターの洗い出し工程を含めることで、殆どのフィブロネクチンを回収できることを示している。

【0066】また、1mg/mlのフィブロネクチンを1mM EDTAを含む5mMリン酸塩緩衝液に溶解させた30mlの溶液を、一定速度(0.2ml/分)及び一定圧力(0.5kg/cm²)のもとでPLANOVA(15nm：0.001m²)に送液して濾過し、次いで緩衝液10mlを濾過して洗浄し、それぞれの濾液を回収して比較したところ、一定速度で行った方が、全体としてフィブロネクチンの回収率が幾分か高かった(図11)。

【0067】(d) 大容量でのフィブロネクチン溶液濾過の検討

スケールアップした場合の回収率を検討する目的で、フィブロネクチン6gを、1mMのEDTAを含んだpH7.4の5mMリン酸塩緩衝液6Lに溶解させることにより濃度1mg/mlのフィブロネクチン溶液を調製した。この溶液を、一定の流速(20ml/分)で、ポアサイズ15nmの表面積1m²のフィルター(PLANOVA：旭化成工業)で濾過し、濾液中のフィブロネクチン量を測定して回収率を算出した。その結果、93.5%の回収率が得られた。

【0068】(8) フィブロネクチンの構造及び機能に対する濾過の影響の検討

緩衝液IIIを用いて濾過する前後のフィブロネクチンにつき、非還元条件下におけるSDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動、BHK細胞接着能試験、及び抗体反応性について検討した。

【0069】(a) フィルター通過前後におけるフィブロネクチンのSDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動：分子中に存在するS-S結合を維持するため非還元条件下に、ポアサイズ15nmのフィルターによる濾過前後の、それぞれ0.25μg、0.5μg、1.0μg及び2.0μgのフィブロネクチンを、常法によりSDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動にかけ、濾過による分子量の変化の有無につきフィブロネクチンの分子量に変化は見られなかった。

【0070】(b) フィルター通過前後におけるフィブロネクチンの細胞接着性：15nmのフィルターによる濾過前後の各濃度のフィブロネクチンを96ウェルのマイクロプレートに固相化した後、ウェルをBSAでブロックし、次いでPBSで洗浄した。これに血清不含有PMI 1640培地中のBHK細胞を一定数(1×10⁵個/50μl/ウェル)播種した。プレートを、37℃にて90分間、加湿した5%CO₂雰囲気下にインキュベートした。細胞がウェルに接着した後、プレートをPBSで2回洗浄した。次いでニュートラルレッド(NR)溶液100μlを各ウェルに加えて、37℃にて1時間、加湿した5%CO₂雰囲気下にインキュベートした。プレートをPBSで2回洗浄した。接着した細胞により取り込まれたNRを抽出するために、抽出剤として0.05Mリン酸二水素ナトリウム/50%エタノールを加え(100μl/ウェル)、室温にて終夜インキュベートした後、546nmにてウェルの吸光度を測定した。その結果、図13に示す通り、フィルターの通過によってはフィブロネクチンの細胞接着性は全く影響を受けていないことが判明した。

【0071】(c) フィルター通過前後におけるフィブ

Sequence Listing

<110> JCR Pharmaceuticals Co., Ltd.
 <120> Method for Producing Fibronectin Filtrate
 <130> P63-99
 <160> 4
 <210> 1
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> porcine parvovirus
 <400> 1
 gatgctaacg catggggagt
 <210> 2
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> porcine parvovirus

ロネクチンと抗ヒトフィブロネクチンモノクローナル抗体との反応性：15nmのフィルターによる濾過前後の各濃度のフィブロネクチンを96ウェルのマイクロプレートに固相化した後、各ウェルに次の抗ヒトフィブロネクチンモノクローナル抗体(宝酒造)0.2μg/100μl/ウェルを加えて一定時間インキュベートした。

- ・抗コラーゲン結合部位(FNC4-4)
- ・抗細胞接着部位(FNC12-8)
- ・抗N末フィブリンヘパリン結合部位(FNC9-1)
- ・抗C末ヘパリン結合部位(FNC3-8)

次いでウェルを洗浄した後、ペルオキシダーゼを接合した二次抗体を加えてウェルをインキュベートした。次いでウェルをペルオキシダーゼの基質(パーオキシダーゼ基質キット：日本バイオラッド社)と共にインキュベートし、415nmにて反応混合液の吸光度を測定することにより、濾過の前後におけるフィブロネクチンに対する各抗体の結合を比較検討した。その結果、図14に示すように、濾過の前後で、これらの抗体とフィブロネクチンとの結合性には全く変化が見られなかった。

【0072】これらの結果から、濾過がフィブロネクチンの分子量、細胞接着性、抗体反応性に影響を及ぼさないことが確認された。

【0073】

【発明の効果】本発明によれば、フィブロネクチンをポアサイズ18nm未満のフィルターに通過させて濾過滅菌を行うことができ、それによりエンベロープウイルス及び非エンベロープウイルス共に除去することができる。特に、フィブロネクチン製剤に関して従来手段のなかった、最小サイズ为非エンベロープウイルスであるパルボウイルスも除去できるため、血漿に基づくフィブロネクチン製剤の安全性を飛躍的に高め、優れたフィブロネクチン製剤の製造を可能にする。

【0074】

【配列表】

<400> 1
 tgtccagtgt atgttggtgg 20
 <210> 3
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> porcine parvovirus
 <400> 1
 ccagcggact ggcagttaat 20

 <210> 4
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> porcine parvovirus
 <400> 1
 gtttcacttc taggtgctgc 20

【図面の簡単な説明】

【図1】 ブタパルボウイルス感染ESK細胞の形態変化。

【図2】 ブタパルボウイルスによるモルモット赤血球凝集反応結果。

【図3】 ポアサイズ15nm及び35nmのフィルター濾液についてのモルモット赤血球凝集反応結果。

【図4】 ウイルス標準液についてのPCR反応結果。

【図5】 チャージ液についてのPCR反応結果。

【図6】 ポアサイズ35nmのフィルター濾液についてのPCR反応結果。

【図7】 ポアサイズ15nmのフィルター濾液についてのPCR反応結果。

【図8】 濃度1mg/mlのフィブロネクチン溶液の

濾過回収率についての予備的検討結果。

【図9】 濃度5mg/mlのフィブロネクチン溶液の濾過回収率についての予備的検討結果。

【図10】 濃度1mg/mlのフィブロネクチン溶液の濾過回収率についての検討結果。

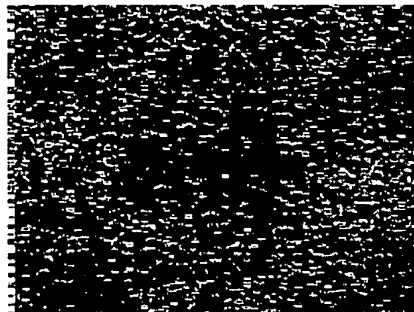
【図11】 送液方法の相違によるフィブロネクチン回収率についての検討結果。

【図12】 濾過の前後におけるフィブロネクチンの分子量変化についての検討結果。

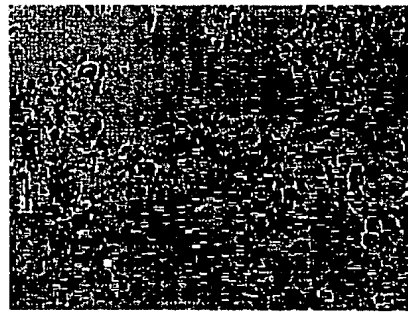
【図13】 濾過の前後におけるフィブロネクチンの細胞接着性の変化についての検討結果。

【図14】 濾過の前後におけるフィブロネクチンの抗体との反応性の変化についての検討結果。

【図1】

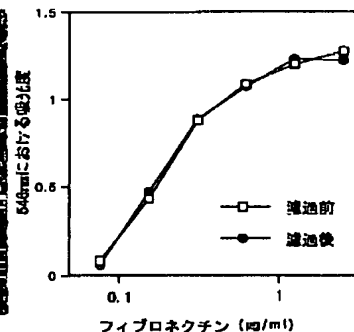


(a) 非感染ESK細胞

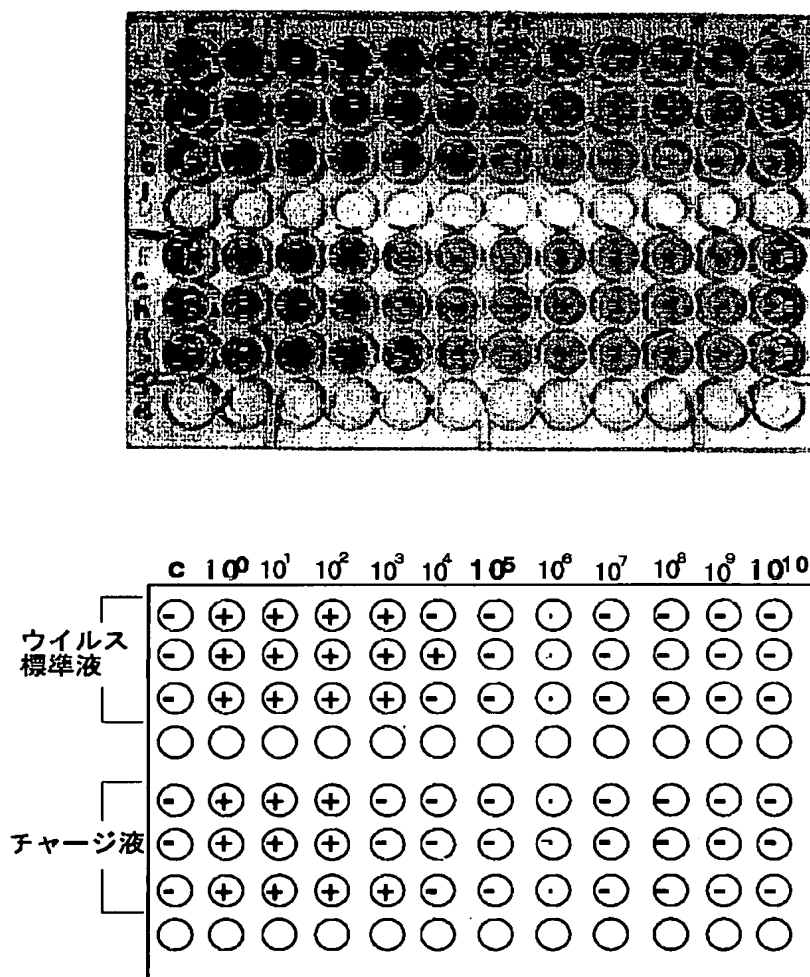


(b) ウイルス感染ESK細胞

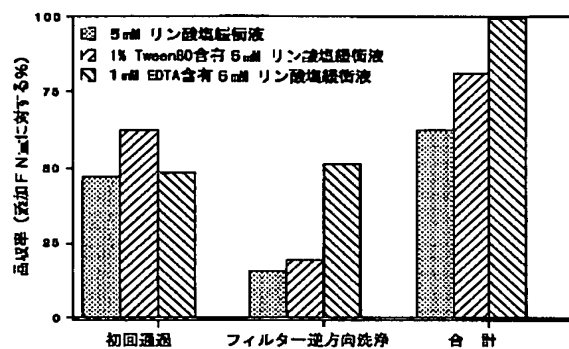
【図13】



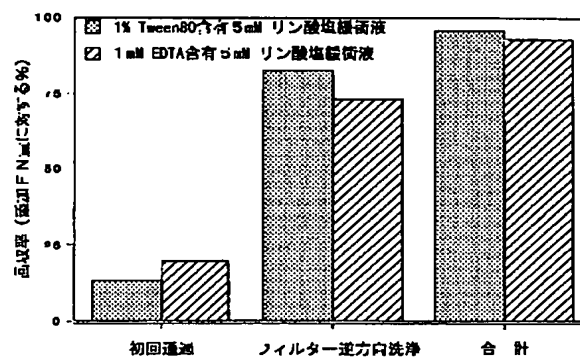
【図2】



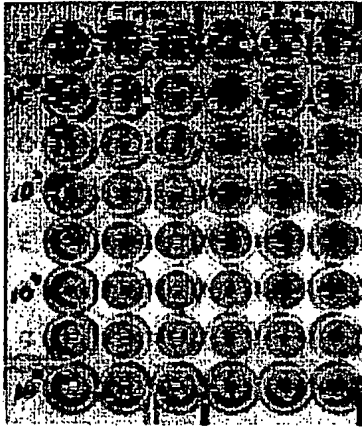
【図8】



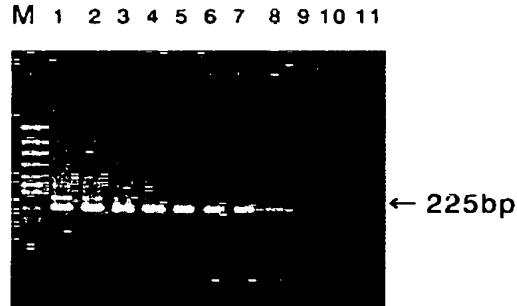
【図9】



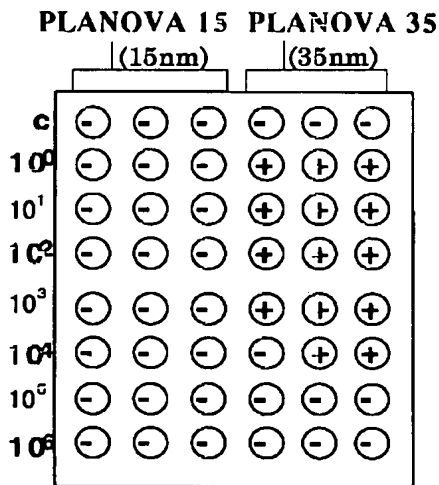
【図3】



【図4】



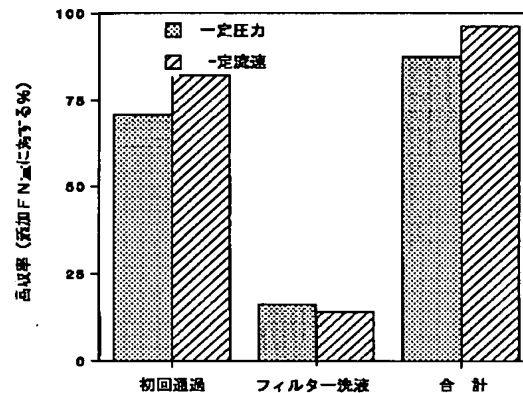
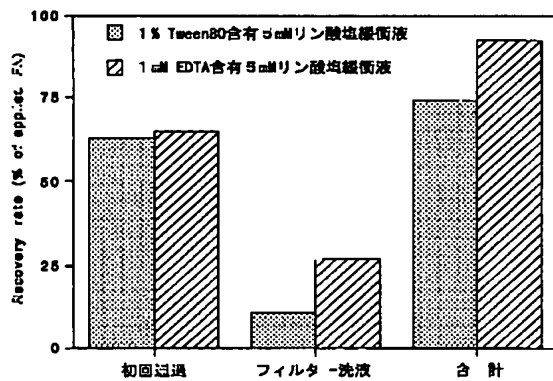
Nested-PCRによるウイルスDNAの検出
(ウイルス標準液)



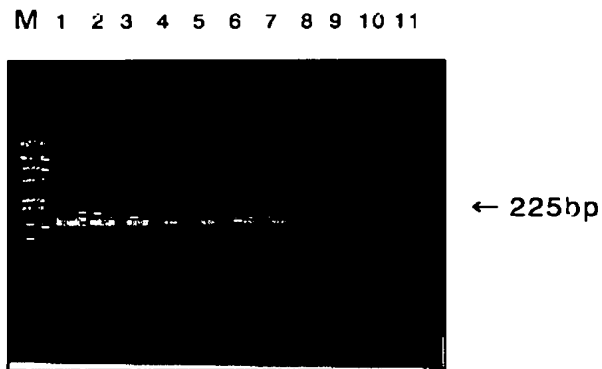
lane M: $\phi \times 174$ /Hinc II
 lane 1: ウイルスDNA抽出液 (原液)
 lane 2: ウイルスDNA抽出液 (10¹倍希釈液)
 lane 3: ウイルスDNA抽出液 (10²倍希釈液)
 lane 4: ウイルスDNA抽出液 (10³倍希釈液)
 lane 5: ウイルスDNA抽出液 (10⁴倍希釈液)
 lane 6: ウイルスDNA抽出液 (10⁵倍希釈液)
 lane 7: ウイルスDNA抽出液 (10⁶倍希釈液)
 lane 8: ウイルスDNA抽出液 (10⁷倍希釈液)
 lane 9: ウイルスDNA抽出液 (10⁸倍希釈液)
 lane 10: ウイルスDNA抽出液 (10⁹倍希釈液)
 lane 11: ウイルスDNA抽出液 (10¹⁰倍希釈液)

【図11】

【図10】



【図5】

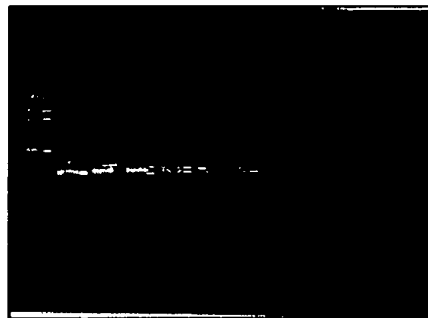


Nested-PCRによるウイルスDNAの検出
(チャージ液)

- lane M : ϕ × 174/Hinc II
- lane 1 : ウイルスDNA抽出液 (原液)
- lane 2 : ウイルスDNA抽出液 (10^1 倍希釈液)
- lane 3 : ウイルスDNA抽出液 (10^2 倍希釈液)
- lane 4 : ウイルスDNA抽出液 (10^3 倍希釈液)
- lane 5 : ウイルスDNA抽出液 (10^4 倍希釈液)
- lane 6 : ウイルスDNA抽出液 (10^5 倍希釈液)
- lane 7 : ウイルスDNA抽出液 (10^6 倍希釈液)
- lane 8 : ウイルスDNA抽出液 (10^7 倍希釈液)
- lane 9 : ウイルスDNA抽出液 (10^8 倍希釈液)
- lane 10 : ウイルスDNA抽出液 (10^9 倍希釈液)
- lane 11 : ウイルスDNA抽出液 (10^{10} 倍希釈液)

【図6】

M 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11



← 225bp

Nested-PCRによるウイルスDNAの検出
(PLANOVA 35 液)

- lane M: ϕ ×174/Hinc II
- lane 1: ウイルスDNA抽出液 (原液)
- lane 2: ウイルスDNA抽出液 (10^1 倍希釈液)
- lane 3: ウイルスDNA抽出液 (10^2 倍希釈液)
- lane 4: ウイルスDNA抽出液 (10^3 倍希釈液)
- lane 5: ウイルスDNA抽出液 (10^4 倍希釈液)
- lane 6: ウイルスDNA抽出液 (10^5 倍希釈液)
- lane 7: ウイルスDNA抽出液 (10^6 倍希釈液)
- lane 8: ウイルスDNA抽出液 (10^7 倍希釈液)
- lane 9: ウイルスDNA抽出液 (10^8 倍希釈液)
- lane 10: ウイルスDNA抽出液 (10^9 倍希釈液)
- lane 11: ウイルスDNA抽出液 (10^{10} 倍希釈液)

【図7】

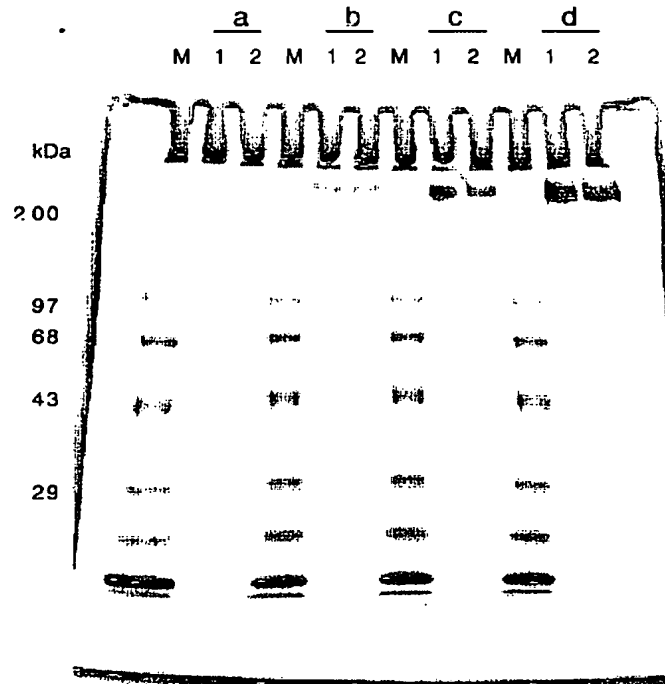
M 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11



Nested-PCRによるウイルスDNAの検出
(PLANOVA15 液)

- lane M: ϕ × 174/Hinc II
- lane 1: ウイルスDNA抽出液 (原液)
- lane 2: ウイルスDNA抽出液 (10^1 倍希釈液)
- lane 3: ウイルスDNA抽出液 (10^2 倍希釈液)
- lane 4: ウイルスDNA抽出液 (10^3 倍希釈液)
- lane 5: ウイルスDNA抽出液 (10^4 倍希釈液)
- lane 6: ウイルスDNA抽出液 (10^5 倍希釈液)
- lane 7: ウイルスDNA抽出液 (10^6 倍希釈液)
- lane 8: ウイルスDNA抽出液 (10^7 倍希釈液)
- lane 9: ウイルスDNA抽出液 (10^8 倍希釈液)
- lane 10: ウイルスDNA抽出液 (10^9 倍希釈液)
- lane 11: ウイルスDNA抽出液 (10^{10} 倍希釈液)

【図12】



Lane M: 分子量マーカー

Lane 1: 濾過前

Lane 2: 濾過後

a: FN 0.25 μ g

b: FN 0.5 μ g

c: FN 1.0 μ g

d: FN 2.0 μ g

【図14】

